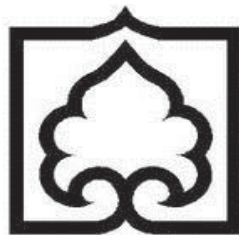


بسم الله الرحمن الرحيم



دانشگاه زنجان

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. Sc.) در رشته ی ژنتیک و اصلاح دام

## **تأثیر سلنیوم بر فعالیت تلومرازى سومایت جنین جوجه**

تحقیق و نگارش

سیده نسیم حسینی

اساتید راهنما

دکتر محمد طاهر هرکی نژاد

دکتر سید سعید حسینی اصل

استاد مشاور

دکتر محسن سقا

اسفند ۱۳۹۳

## چکیده

مقدمه: سلنیوم یک عنصر کمیاب ضروری برای عملکردهای مختلف فیزیولوژیک است که برای بسیاری از فرآیندهای سلولی مهم است. این عنصر به صورت ترکیبات سلنوپروتئینی از بعضی از انواع بیماری‌ها پیشگیری می‌کند. سومايت‌ها توده‌هایی از سلول‌های مزودرمی در طرفین لوله‌ی عصبی هستند که به دنده‌ها، مهره‌ها و عضلات تمایز می‌یابند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سلنیوم بر فعالیت تلومرازی سومايت جنین جوجه بود. تخم مرغ‌های نطفه‌دار از نژاد راس تهیه شدند و در ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند، جنین‌ها در مرحله ی هشت الی ۱۰ جنینی در ساعات ۳۶-۳۸ پس از شروع انکوباسیون (ستر) از سطح زرده خارج شده و در محیط Leiboritzs<sup>۱۵</sup> قرار داده شدند، سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سلنو-ال-متیونین، سلنیت سدیم و کادمیوم کلراید در دوزهای دو و نیم، پنج و ده میکرومول به منطقه‌ی حاوی سومايت به مدت شش ساعت تأثیر داده شد. فعالیت تلومراز در بافت‌های جنینی استخراج شده، با استفاده از روش کیفی TRAP assay و روش کمی RTQ-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از فعالیت تلومرازی در نمونه‌های سومايت تحت تأثیر هر سه ماده‌ی فوق‌الذکر مثبت و به عنوان نردبان شش جفت بازی با تکثیر بالا و کنترل داخلی ۳۶ جفت بازی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بین تیمارها مختلف سلنو-ال-متیونین، سلنیت سدیم و کادمیوم کلراید تفاوت معنی داری وجود ندارد اما بیان تلومراز در نمونه های تیمار شده بیشتر از گروه کنترل است.

واژگان کلیدی: سلنیوم، فعالیت تلومرازی، سومايت، جنین جوجه.

## فهرست مطالب

### عنوان

#### صفحه فصل اول: مقدمه

- ۱-۱ سلنیوم ..... ۲
- ۱-۲ تلومر ..... ۳
- ۱-۳ تلومراز ..... ۵

#### فصل دوم: بررسی منابع

- ۲-۱ سومات و سومات‌زایی ..... ۹
- ۲-۱-۱ سومات ..... ۱۱۰
- ۲-۱-۲ سوماتوژنز ..... ۲۱۲
- ۲-۱-۳ تنظیم مولکولی تمایز سومات‌ها ..... ۳۱۳
- ۲-۲ سلنیوم ..... ۴۱۴
- ۲-۲-۱ نقش سلنیوم در بیوشیمی بدن ..... ۱۵
- ۲-۲-۲ منابع قابل دسترس سلنیوم و تولید پروتئین ..... ۱۷
- ۲-۲-۳ سمیت سلنیوم ..... ۱۸
- ۲-۲-۴ اثرات کمبود سلنیوم بر سلامتی ..... ۱۹
- ۲-۳ تلومر ..... ۲۰۲۱

- ۲۳-۳-۱ تلومرها تکرارهای پشت سرهم و پروتئین‌های حفاظتی ..... ۲۳
- ۲۳-۳-۲ بیولوژی تلومر مهره‌دارن ..... ۲۵
- ۲۳-۳-۳ ساختار تلومر در پستانداران ..... ۲۸
- ۲۳-۳-۴ اهمیت تلومر ..... ۳۱
- ۲۳-۳-۵ مشکل انتهایی همانندسازی کروموزم ..... ۳۳
- ۲۳-۳-۶ کنترل اندازه‌ی تلومر ..... ۳۷
- ۲۳-۳-۷ کاربردهای کلینیکی اندازه‌گیری طول تلومرها ..... ۳۹
- ۲۳-۳-۸ بیماری‌های ناشی از اختلالات تلومری ..... ۴۰
- ۲-۴ بررسی تلومر مرغ به عنوان مدل مهم تحقیقاتی ..... ۴۲
- ۲-۴-۱ بیولوژی تلومر طیور ..... ۴۳
- ۲-۴-۲ سازمان‌یابی آرایه‌های تلومری جوجه ..... ۴۵
- ۲-۴-۳ اهداف بررسی ویژگی‌های تلومر و تلومراز مرغ ..... ۴۶
- ۲-۵ کلونینگ ..... ۴۸
- ۲-۵-۱ آنالیز طول تلومر در حیوانات کلون شده ..... ۴۹
- ۲-۵-۲ انتقال هسته‌ای و تلومر ..... ۵۲
- ۲-۶ تلومراز، آنزیم رونویسی معکوس ..... ۵۴
- ۲-۶-۱ آنالیز فعالیت تلومراز در سلول‌های زایا و پیکری ..... ۵۷
- ۲-۶-۲ عملکرد آنزیم تلومراز در مرغ ..... ۵۸

۲-۷ تلومراز و ارتباط آن با بروز سرطان..... ۶۲

۲-۸ نظریه پیری تلومر..... ۶۵

۲-۸-۱ گذشت زمان..... ۶۵

۲-۸-۲ پیری زودرس..... ۶۷

۲-۸-۳ کوتاهی تلومر و عدم فعالیت تلومراز..... ۶۸

### فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ مواد و دستگاه‌ها..... ۷۰

۳-۲ روش‌ها..... ۷۷۸

۳-۲-۱ انکوباسیون تخم مرغ و جدا سازی جنین جوجه از زرده..... ۷۷۸

۳-۲-۲ تهیه آب فاقد RNAes..... ۸۲

۳-۲-۳ تهیه مواد لازم برای واکنش TRAP..... ۸۲

۳-۲-۳-۲ محلول‌های تهیه شده با Water DEPC

۸۲.....

۳-۲-۴ استخراج پروتئین (آنزیم تلومراز) سومایت جنین جوجه..... ۸۳

۳-۲-۵ اندازه گیری میزان پروتئین استخراجی..... ۸۴

۳-۲-۶ سنجش TRAP assey..... ۸۴

۳-۲-۷ تهیه ژل پلی آکریل آمید جهت بررسی محصولات سنجش TRAP assay..... ۸۵

۳-۲-۸ روش بستن تانک و قالب گیری ژل..... ۸۶

۸۷.....۳-۲-۹ روش رنگ آمیزی نیترا ت نقره.

۸۸.....SYBER Green RTQ-TRAP assey روش ۳-۲-۱۰

#### فصل چهارم: نتایج و بحث

۹۰..... ۴-۱ بررسی کیفی فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با سلنو-ال-متیونین

۹۱..... ۴-۲ بررسی کمی فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با سلنو-ال-متیونین

۹۳..... ۴-۳ بررسی کیفی فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با سلنیت سدیم

۹۴..... ۴-۴ بررسی کمی فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با سلنیت سدیم

۹۶..... ۴-۵ بررسی کیفی فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با کادمیوم کلراید

۹۷..... ۴-۶ بررسی کمی فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با کادمیوم کلراید

**Error!** ۴-۷ بررسی کیفی و کمی تاثیر سلنو-ال-متیونین بر فعالیت تلومرازی سومایت ها

**Bookmark not defined.**

**Error! Bookmark** ۴-۸ بررسی کیفی و کمی تاثیر سلنیت سدیم بر فعالیت تلومرازی سومایت ها

**not defined.**

**Error!** ۴-۹ بررسی کیفی و کمی تاثیر کادمیوم کلراید بر فعالیت تلومرازی سومایت ها

**Bookmark not defined.**

۱۰۷..... نتیجه گیری و پیشنهادات کلی.

۱۰۸..... منابع.

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲: تصویر شماتیک از تنظیم مولکولی تمایز سومیت ها، موقعیت و بافت های پیرامون آن.. ۳۱۳	
شکل ۲-۲: توزیع سلنیوم در غذاهای اصلی ..... ۱۷	
شکل ۲-۳: تصویر شماتیک از چرخه شکست-اتصال-پل ..... ۲۲	
شکل ۲-۴: ساختار تلومر ..... ۲۷	
شکل ۲-۵: فرم بسته و باز تلومر ..... ۲۸	
شکل ۲-۶: کمپلکس شلترین ..... ۲۹	
شکل ۲-۷: مشکل انتهایی همانند سازی کروموزوم ..... ۳۴	
شکل ۲-۸: فرضیه دو مرحله ای پیری سلولی و نامیرایی ..... ۳۶	
شکل ۲-۹: تنوعات موجود در محل و غلظت توالی تلومری در ژنوم جوجه..... ۴۴	
شکل ۲-۱۰: آرایه های تلومری در کروموزوم های جوجه و انسان..... ۴۶	
شکل ۲-۱۱: تصویر شماتیک از فرآیند کلونینگ..... ۵۳	
شکل ۲-۱۲: کوتاه شدن تلومر و بحران سلولی ..... ۶۳	
شکل ۱۳-۲: کوتاه شدن تلومر و سرطان ..... ۶۴	
شکل ۲-۱۴: پیامدهای گذشت زمان و فرسایش تلومرها ..... ۶۷	
شکل ۳-۱: انکوبه کردن تخم مرغ ها..... ۷۷۸	
شکل ۳-۲: قرار دادن تخم مرغ ها در ظروف استریل ..... ۷۸	



شکل ۳-۳: استخراج جنین از سطح زرده با کاغذ صافی.....	۷۹
شکل ۳-۴: جنین های جدا شده در محیط کشت L۱۵.....	۷۹
شکل ۳-۵: سومایت جنین جوجه.....	۸۰
شکل ۳-۶: جنین جوجه در مرحله ۱۰ سومایتی.....	۸۱
شکل ۳-۷: ژل الکتروفورز.....	۸۷
شکل ۴-۱: فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با غلظت های مختلف سلنو-ال-متیونین به روش TRAP assay.....	۹۰
شکل ۴-۲: فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با غلظت های مختلف سلنو-ال-متیونین توسط RTQ-TRAP assay.....	۱۹۲
شکل ۴-۳: فعالیت تلومرازی سومایت های تحت تیمار با غلظت های مختلف سلنیت سدیم به روش TRAP-Assay.....	۹۳
شکل ۴-۴: فعالیت تلومرازی سومایت ها در غلظت های مختلف سلنیت سدیم در مقایسه با گروه تیمار نشده توسط RTQ-TRAP assay.....	۴۹۵
شکل ۴-۵: فعالیت تلومرازی سومایت ها در غلظت های کادمیوم کلراید با TRAP-Assay.....	۶۹۷
شکل ۴-۶: فعالیت تلومرازی سومایت ها در غلظت های مختلف کادمیوم کلراید در مقایسه با گروه تیمار نشده توسط RTQ-TRAP assay.....	۹۷

## فهرست جداول و نمودارها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲: سیتوژنیک و ویژگی‌های تلومر گونه‌های حیوانی مهره‌دار.....	۴۴۶
جدول ۱-۳: دستگاه‌ها.....	۷۰-۷۱
جدول ۲-۳: مواد لازم برای انکوباسیون تخم مرغ و جداسازی جنین جوجه.....	۷۲
جدول ۳-۳: مواد لازم برای تأثیردهی.....	۷۲
جدول ۴-۳: مواد لازم برای استخراج پروتئین (آنزیم تلومراز).....	۷۳
جدول ۵-۳: مواد لازم برای سنجش TRAP Assay.....	۷۴
جدول ۱-۳-۵: الیگونوکلوئوتیدهای مورد استفاده در سنجش TRAP assay.....	۷۴
جدول ۶-۳: مواد لازم جهت الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید.....	۷۵
جدول ۷-۳: بافر بارگذاری.....	۷۵
جدول ۸-۳: مواد لازم جهت رنگ‌آمیزی نیترات نقره.....	۷۶
جدول ۹-۳: مواد لازم برای SYBR Green RT-TRAP Assay.....	۷۶
جدول ۱-۴: میانگین و انحراف معیار چرخه آستانه سومات‌ها در گروه‌های کنترل و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سلنو-ال-متیونین.....	۲۹۳
جدول ۲-۴: میانگین و انحراف معیار چرخه آستانه سومات‌ها در گروه‌های کنترل و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سلنیت سدیم.....	۵۹۶
جدول ۳-۴: میانگین و انحراف معیار چرخه آستانه سومات‌ها در گروه‌های کنترل و تحت تیمار با غلظت‌های کادمیوم کلراید.....	۹۸

نمودار ۱-۴: فعالیت تلومرازی سومایت‌های تحت تیمار با سلنو-ال متیونین.....

۲۹۳

نمودار ۲-۴: فعالیت تلومرازی سومایت‌های تحت تیمار با سلنیت سدیم.....۵۹۶

نمودار ۳-۴: فعالیت تلومرازی سومایت‌های تحت تیمار با کادمیوم کلراید .....۹۸

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱ سلنیوم

مصرف مکمل‌های سلنیوم با دوزهای پایین نه تنها برای پیش‌گیری از سرطان مفید می‌باشد بلکه می‌تواند تأثیرات مثبت بسیاری روی عملکردهای دیگر در موجود زنده از جمله کاهش بیماری‌های قلبی، کاهش التهاب و تنظیم فشار خون داشته باشد (Brozmanova et al., ۲۰۱۰).

ترکیبات سلنیومی، به عنوان عوامل شیمیایی پیش‌گیری کننده<sup>۱</sup> با توانایی آن‌ها در تنظیم چرخه سلولی، تحریک آپوپتوز و مهار مهاجرت سلول‌های تومور در داخل بدن و همچنین مهار متاستاز در شرایط آزمایشگاهی در ارتباط می‌باشد (Zeng et al., ۲۰۰۸).

سلنیوم یک عنصر کمیاب ضروری برای عملکردهای مختلف فیزیولوژیک در بدن است که برای بسیاری از فرآیندهای سلولی مهم است (Thomson et al., ۲۰۰۴; Gold haber., et al ۲۰۰۳; Lu et al., ۲۰۰۹ and Papp et al., ۲۰۰۷).

مواد غذایی (غلات، حبوبات، سبزیجات) حاوی مقادیر و اشکال شیمیایی مختلفی از سلنیوم هستند (Navarro-alarcon et al., ۲۰۰۸). مصرف سلنیوم به میزان ۵۰ میکروگرم در روز مناسب تخمین زده شده است و سطوح ۳۵۰ تا ۷۰۰ میکروگرم آن در روز باعث بروز مسمومیت می‌گردد (Council et al., ۲۰۰۰).

فعالیت تلومراز در بافت‌های جوجه در شرایط آزمایشگاهی توسط Taylor و Delany بررسی شد (Delany and Taylor, ۲۰۰۰). طی این آزمایشات فعالیت بالای تلومراز در مراحل اولیه جنینی در جوجه دیده شد. پس از آن فعالیت تلومراز در اکثر بافت‌های سوماتیک قطع و در برخی بافت‌های خاص با بی

---

<sup>۱</sup> Chemo Preventive